

ヒ酸耐性ロドコッカス属細菌の解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○宮本和宜

東北学院大学 工学部 非会員 木村隆文

長岡技術科学大学 工学部 非会員 福田雅夫

東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗

東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介

1. 序

ヒ素による環境汚染・地下水汚染は、世界規模で深刻な環境問題となっている。その処理対策は主に封じ込め、固化・不溶化、廃棄物としての埋め立て処分などがある。これらの処理対策は一時的なものであり、必ずしも根本的な浄化方法とは言えない。また熱処理や電気化学的処理は高コストの為、あまり用いられていない。一般的には硫酸やシュウ酸などを用いた土壌浄化による抽出が比較的有効な浄化手法とされているが、浄化後に土壌機能を損なってしまう恐れがある。そこで本研究室では、土壌機能を損なうことなくかつ低コストで行うことが可能とされる、微生物を利用した生物学的な浄化技術の開発を目的として研究を進めている。

Rhodococcus erythropolis IAM1399 は、当研究室で *Rhodococcus* 属細菌の宿主として用いている細菌であり、同じ *Rhodococcus* 属である *Rhodococcus jostii* RHA1 等と比べて非常に高いヒ素耐性能があることがこれまでの予備的な実験で明らかになっている。本研究では IAM1399 のヒ素耐性機構を解明するために、(1) IAM1399 のヒ素耐性能の評価、及び(2) ヒ素耐性遺伝子群の単離を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1 IAM1399 のヒ素耐性能の評価

(1) LB 液体培地 10 ml に IAM1399 を接種し、30℃で一晩培養した。

(2) 新しい LB 液体培地に前培養した菌液を入れ、As(III)としてメタ亜ヒ素ナトリウム(NaAsO_2)を 10 mM、15 mM、20 mM、As(V)としてヒ素水素ナトリウム(Na_2HAsO_4)を 50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、

400 mM になるように加えた。ヒ素を含まない LB 液体培地は 0 mM と表記する。

(3) 0 時間から 15 分毎に 48 時間 OD₆₆₀ を測定した。

2-2 ヒ素耐性遺伝子群の単離

(1) *arsB* 増幅のための PCR には、プライマー F1 (5'-ATCATGATGTACCCGGTG-3')、R1 (5'-GAGGTGTCGATGGTGGTCTG-3')を使用した。

(2) サザン解析のプロンプとしては、ジゴキシゲニン(DIG)で標識した(1)の PCR 産物を用いた。

3. 実験結果

3-1 IAM1399 株のヒ素耐性評価

IAM1399 のヒ素耐性を調べるために、IAM1399 の菌液を様々な濃度のヒ素を含む LB 液体培地に接種し、0 時間から 15 分毎に 48 時間 OD₆₆₀ を測定した。

ヒ酸耐性を調べた結果を図-1 に、亜ヒ酸耐性を調べた結果を図-2 に示す。50 mM のヒ酸存在下での IAM1399 の生育については、増殖が始まる時間は異なるが、0 mM とほぼ同じ生育速度となった。100 mM から 400 mM のヒ酸存在下での生育は、ヒ酸濃度が濃くなるにつれて傾きが緩くなっていることが分かる(図-1)。10 mM の亜ヒ酸存在下での生育については、増殖が始まる時間は異なるものの、0 mM とほぼ同じ生育速度となった。15 mM の亜ヒ酸存在下での生育は、0 mM と比較すると生育し始める時間に 30 時間ほど遅れがあるものの、生育し始めてからは同じような生育速度を示した。

以上の結果から、IAM1399 はヒ酸については 400 mM、亜ヒ酸については 15 mM まで耐性を示すことが明らかとなった。*R. jostii* RHA1 のヒ素耐性能はヒ酸は 30 mM、亜ヒ酸では 3 mM までであることが明

キーワード 微生物 ヒ素 環境浄化

連絡先 宮内啓介 (宮城県多賀城市中央 1-13-1)

TEL 022-368-7445

らかになっており、IAM1399 は RHA1 と比べると、ヒ酸耐性は 10 倍以上、亜ヒ酸耐性は 5 倍という非常に高いヒ素耐性を示した。

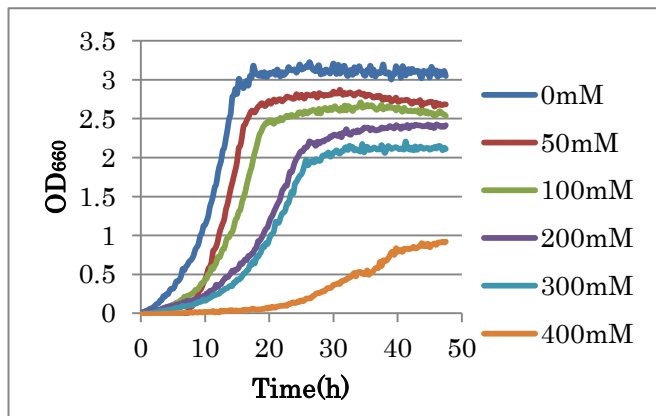


図-1 ヒ酸存在下での IAM1399 の生育

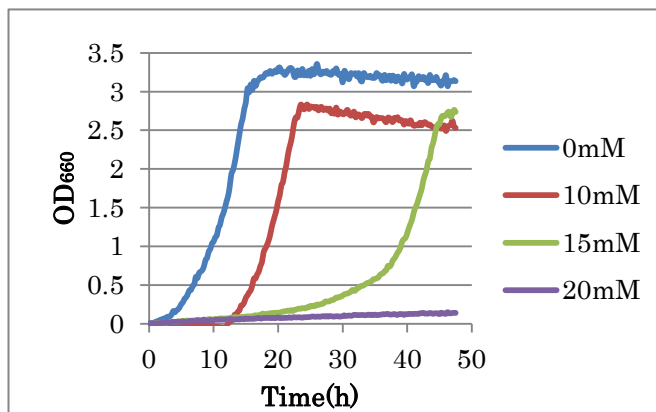


図-2 亜ヒ酸存在下での IAM1399 の生育

3-2 ヒ素耐性遺伝子群の単離

IAM1399 の高いヒ素耐性能の原因を明らかにするため、本菌のヒ素耐性遺伝子の単離を試みた。既知の *arsB* 遺伝子配列を元にして *arsB* 増幅用プライマー(配列は 2-2(1))を設計し、IAM1399 の total DNA を鋳型にして PCR を行った。予想された 360 bp の DNA 断片が増幅したためこの断片の塩基配列を決定したところ、*arsB* と高い相同性を示した。そこでこの *arsB* 部分配列をプローブとして、制限酵素で処理した IAM1399 total DNA に対してサザン解析を行った。その結果 2 本のバンドが検出された(図 3)。この結果から、IAM1399 ゲノム中には少なくとも 2 種類のヒ素耐性遺伝子群が存在すると考えられた。

次に、大腸菌 DH5 中に IAM1399 の DNA ライブラリーを構築し、サザン解析で用いた *arsB* の部分配列をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、陽性クローンを 1 つ取得することに成功した。このクローン中には 7 kb の DNA 断片

が挿入されていることが確認された。

この DNA 断片の塩基配列を決定し、Blast を用いて相同性検索を行った。その結果、この断片中には *Rhodococcus* 属のヒ素耐性遺伝子群と非常に高い相同性を示す 3 つのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在した。相同性からこれらの ORF を *arsR*、*arsB*、*arsC* と命名した(図 4)。ArsR は *arsRBC* オペロンの転写制御因子、ArsB は亜ヒ酸を排出するための膜結合タンパク質、ArsC は 5 価のヒ酸を 3 価の亜ヒ酸に還元するリダクターゼであると考えられる。

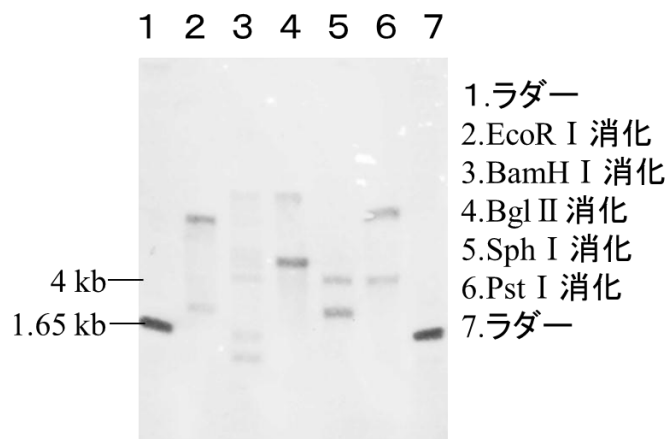


図 3 *arsB* 部分配列をプローブとして用いたサザン解析の結果

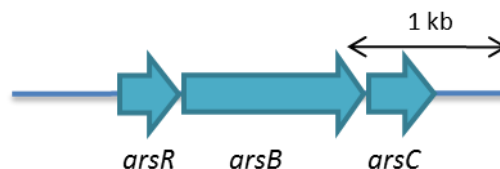


図 4 IAM1399 のヒ素耐性遺伝子群

4. 結論

本研究によって、IAM1399 は、ヒ酸については 400 mM、亜ヒ酸については 15 mM まで耐性を示す結果となり、非常に高いヒ素耐性を持っていることが明らかになった。

また IAM1399 のヒ素耐性遺伝子群の単離に成功した。この配列は既知のヒ素耐性遺伝子群と高い相同性を示した。